

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-201476

(43)Date of publication of application : 04.08.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12Q 1/68

G01N 33/50

G01N 33/566

G01N 33/58

(21)Application number : 09-010996

(71)Applicant : TOSOH CORP

(22)Date of filing : 24.01.1997

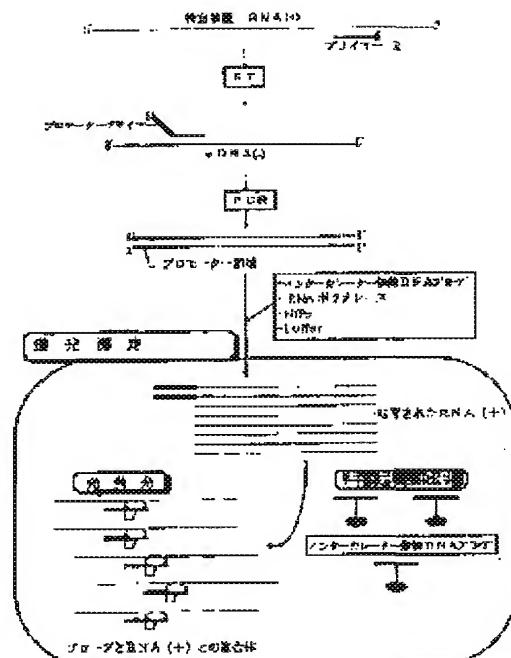
(72)Inventor : ISHIGURO NORIHIKO
SAITO JUICHI

(54) ANALYSIS OF NUCLEIC ACID SEQUENCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method useful for gene diagnosis, etc., through analyzing a specific nucleic acid in a highly precise way, by using the nucleic acid in a sample as a template and treating it under specific conditions.

SOLUTION: This analysis method includes a process for producing a double-stranded DNA having the nucleic acid sequence of a specific nucleic acid in a promotor sequence for RNA polymerase (downstream), and a process for producing and assaying a single-stranded RNA, wherein the above processes uses the specific nucleic acid in a sample as a template. The process for RNA production and assay is initiated by adding at least RNA polymerase, ribonucleoside triphosphates and a probe labelled with an intercalator type fluorescent dye containing a sequence complementary to the produced RNA to the reaction liquid after ending the DNA production process, includes a process for assaying fluorescence intensity of the reaction liquid and is performed at a constant temperature, the specific nucleic acid being analyzed by a hybridization process including denaturing annealing and without separation of any probe not complexing with the RNA produced by the process.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-201476

(43) 公開日 平成10年(1998)8月4日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	P
33/566		33/566	
33/58		33/58	A

(21)出願番号 特願平9-10996

(22)出願日 平成9年(1997)1月24日

(71)出願人 000003300

東ソ一株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72)発明者 石黒 敬彦

神奈川県横浜市神奈川区六角橋 5-21-33

-102-

(72) 発明者 斎藤 寿一

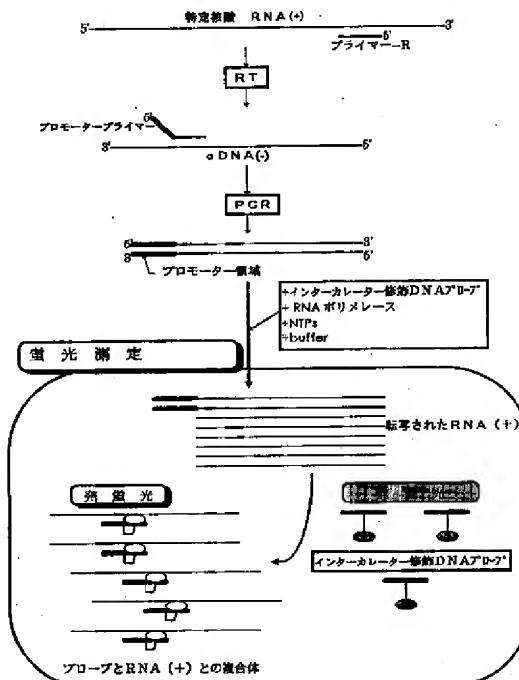
神奈川県大和市桜森 2-20-16-101

(54) 【発明の名称】 核酸配列分析方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】特定核酸配列の分析方法の提供。

【解決手段】試料中の特定核酸を鋳型として、その上流域にRNAポリメラースのプロモーター配列及びその下流域に前記特定核酸の核酸配列を有するDNAと相補的DNAから成る二本鎖DNAを生成するDNA生成工程と、当該DNA及びRNAポリメラースによる特定核酸配列を有する一本鎖RNAの生成測定工程からなり、該RNA生成測定工程はDNA生成工程終了後、その反応液に少なくともRNAポリメラース、リボヌクレオシド三磷酸及び生成されるRNAに相補的配列を含むインターラーカー性蛍光色素で標識されたプローブの存在によって開始され、反応液の蛍光強度測定工程を含み、かつ、該工程が一定温度において実施され、デネーチャーリング・アニーリングからなるハイブリダイゼーション操作及び該工程により生成されるRNAと複合体を形成していないプローブ分離操作を含まない特定核酸分析方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】特定核酸を含むと予想される試料中の特定核酸の分析において、試料中の特定核酸を錆型として、RNAポリメラーゼのプロモーター配列及びその下流域に前記特定核酸の核酸配列（特定核酸配列）を有する二本鎖DNAを生成するDNA生成工程と、当該RNAポリメラーゼによって特定核酸配列を有する一本鎖RNAを生成し測定するRNA生成・測定工程からなり、ここで該RNA生成・測定工程は、DNA生成工程終了後、その反応液に少なくともRNAポリメラーゼ、リボヌクレオシド三磷酸及び生成されるRNAに相補的な配列を含むインターラーカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが添加されることによって開始され、反応液の蛍光強度を測定する工程を含み、かつ、一定温度において実施され、デネーチャーリング・アニーリングからなるハイブリダイゼーション操作及び該工程により生成されるRNAと複合体を形成していないプローブを分離する操作を含まないことを特徴とする特定核酸分析方法。

【請求項2】前記インターラーカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが、RNAポリメラーゼによって生成するRNAとの相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化することを特徴とする、特許請求項1に記載の分析方法。

【請求項3】前記インターラーカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが、RNAポリメラーゼによって生成するRNAとの相補結合によって、そのインターラーカレーター性蛍光色素が生成したRNAとプローブの間にインターラーションする性質を有することを特徴とする、請求項1又は2に記載の分析方法。

【請求項4】前記DNA生成工程が、特定核酸配列に相補的な配列からなる一組のプライマーを用い、その一方のプライマーはその5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有すプロモータープライマーであって、それらのプライマー及びDNAポリメラーゼの存在下で特定核酸配列を有する二本鎖DNAを合成することからなることを特徴とする、請求項1に記載の分析方法。

【請求項5】特定核酸が一本鎖RNAである場合において、前記DNA生成工程が、前記プロモータープライマーを含む一組のプライマーを用い、それらのプライマーの少なくとも一方のプライマー及びデオキシリボヌクレオシド三磷酸の存在下で逆転写酵素を用いて特定核酸に相補的なcDNAを生成し、これに引き続き、他方のプライマー及びDNAポリメラーゼの存在下にて特定核酸配列を有する二本鎖DNAの合成を実施することを特徴とする、請求項4に記載の分析方法。

【請求項6】前記DNA生成工程が、ポリメラーゼチェインリアクション（PCR）法によってDNAを増幅する操作を含むことを特徴とする、請求項4又は5に記載の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、DNAやRNA等の遺伝子混合中に含まれると予想される特定核酸を定性又は定量するための分析方法に關し、遺伝子診断等の臨床診断分野での利用、有用遺伝子のクローニングでの利用、並びに未知遺伝子の探索等の分野での利用に有用であり、更には、遺伝子を増幅する工程に関する反応条件を最適化する方法としても有用である。

【0002】

【従来の技術】特定核酸の分析には、特定核酸配列がその塩基配列と相補的な配列を有するプローブ（核酸プローブ）と相補結合を形成する性質が利用されている。

【0003】例えば従来より、特定核酸の異なる部位の特定配列に対して相補結合を形成し得る配列からなる二種類のプローブを用いるサンドイッチアッセイと呼ばれる方法が知られている。この方法では、第一のプローブは不溶性担体に固定化されており、一方第二のプローブはその一部に可視部に色を持つ色素や蛍光物質あるいはそれらを生成し得る酵素で標識されている。そして、試料にこれらのプローブを添加し、試料中の特定核酸を第一及び第二のプローブと相補結合させ、これら3者からなる複合体を不溶性担体上に形成させる。引き続き、試料反応液中の上清と不溶性担体とを分離し、上記複合体を形成していない第二のプローブを分離する（B/F分離工程）。しかる後、不溶性担体上の複合体中の標識物質を測定することにより、試料中の特定核酸の有無及び量を決定するのである。ここで、可視部に色を持つ色素や蛍光物質を生成し得る酵素を第二の標識として用いる場合は、上記複合体形成工程後、複合体を形成していない第二プローブを除去した後に、それらの前駆体である酵素基質を試料反応液に添加し、その反応産物である色素や蛍光物質を測定することにより、試料中の標的核酸の有無及びその量を決定する。

【0004】近年、ポリメラーゼチェインリアクション（PCR）法が開発されたことにより、試験管内条件下で試料中の特定核酸の特定領域を増幅し、分析するに充分な量を調製することが可能となったことから、PCR法を用いて試料中の特定核酸の特定領域を増幅した後、その反応液を試料として上記のサンドイッチアッセイによって増幅産物を測定することで、増幅前の試料中の特定核酸の有無及び量を決定することも行われている。また、特定核酸配列の特定領域に相補的な配列からなるプローブを、前記PCR法等によって増幅後、その反応液に添加して増幅核酸と相補結合を形成する条件下において、形成された複合体を電気泳動法によって未反応のプローブから分離することにより、増幅後の増幅産物の分析を行う方法も提案されている。

【0005】サンドイッチアッセイでは、反応液中に不溶性担体を利用することから、第二のプローブがこの不溶性担体に非特異的に吸着し、不溶性担体上の複合体中

の標識を測定する段階で、この不溶性担体上に非特異的に吸着した第二のプローブの標識の存在により測定結果に誤差が生じ、試料中の特定核酸の有無及びその量を決定する際に問題が生じる。特に、ウイルス感染症の診断では、臨床試料中の極微量のウイルス核酸を良好な再現性で高感度に検出することが要求されることから、上記の非特異的吸着に由来する問題は解決すべき重要な課題となっている。この問題を回避する目的で、不溶性担体表面の親水化処理、蛋白質等による担体表面の吸着点のブロッキング、B/F分離工程に統一して不溶性担体を十分洗浄すること等が試みられている。

【0006】しかしながら、担体表面を化学的に親水化処理等することは、その可否が担体の材質に依存するうえ、技術的に必ずしも容易ではない。また担体表面の吸着点を予めブロッキングする目的で担体表面を蛋白質によって被覆する方法では、その蛋白質が第二のプローブの核酸部分又は標識と相互作用し、担体への新たな非特異的吸着を招く可能性もある。更に、B/F分離工程においては、不溶性担体の洗浄回数を増やすことは操作上の限界があり、例えば洗浄液に界面活性剤を添加する等した場合、担体上に形成されている複合体の分解を促す可能性もある。

【0007】また、PCR法により特定核酸の特定領域を増幅した後にサンドイッチアッセイを行う場合は、PCRによる増幅産物が二本鎖DNAであることから、プローブと増幅された核酸との相補結合を形成させるには、増幅反応液へプローブを添加後、増幅産物である二本鎖DNAを一旦融解し一本鎖とするための加温操作（デネーチャーリング/denaturing）と、その後冷却してプローブDNAに標的DNAとの二本鎖DNAを形成させるための操作（アニーリング/annealing）が不可欠となり、効率性と経済性を一般的な要求とする臨床診断の現場に対して新たな労力と分析時間を要求することとなる。

【0008】前記した電気泳動法を利用する分析法においては、特に、PCR終了後、反応容器から増幅された分析用試料を取り出す必要があり、PCR法の実際的な応用における課題とされる、増幅産物の飛散に由来する擬陽性の惹起という課題をも生じる。

【0009】そこで、上記のような担体を使用せず、プローブの標識を測定するに際してデネーチャーリング・アニーリングからなる操作を含まず、かつ、可能な限りPCR等により増幅された核酸の飛散を排除し得る分析法の開発が求められることとなる。

【0010】担体を使用しない分析法として、インターラーカレーター性蛍光色素の存在下でPCRを行い、反応液の蛍光を測定することによる分析法が提案されている（例えば、特開平5-237000号公報／医学のあゆみ、173(12)、959-963(1995)／Analytical Biochemistry、22

9、207-213(1995)等参照）。すなわち、PCRによる増幅産物が二本鎖DNAであることから、二本鎖核酸にインターラーカレーションし蛍光強度が増大する等、その蛍光特性が変化する性質を有するインターラーカレーター性蛍光色素を用い、これをPCRによる増幅操作前に予め試料溶液に添加し、反応溶液の蛍光強度を経時的に測定することにより、増幅前の標的核酸の有無及び量を決定するのである。

【0011】この方法によれば、密閉した反応容器内部の反応液の蛍光強度の測定からPCRの進行を追跡することが可能となり、試料容器内部から反応液を採取して分析する必要がないため、増幅産物の飛散に由来する擬陽性の惹起という課題を回避することが可能となる。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】このように、インターラーカレーター性蛍光色素の存在下でPCRを行い、反応液の蛍光を測定することによる分析法は、担体を使用しない、即ち均一な反応液による系（均一系）での一段階の操作による分析法として優れた特徴を有する。

【0013】しかしながら、この方法は、インターラーカレーター性蛍光色素が二本鎖核酸に非特異的にインターラーカレーションすることに由来して、試料中に特定核酸以外に、例えば大量のゲノムDNAが混在する場合には、インターラーカレーター性蛍光色素がこれらにもインターラーカレーションすることによって大きなバックグラウンドが生じ、特定核酸の増幅に由来する蛍光特性の変化を高精度で測定することが困難になるという課題があった。また、PCR法では、特定核酸の特定の領域に相補的な一对の核酸を伸長反応のプライマーとして用いるが、このプライマーの配列によってはこれらが互いに相補結合する場合があり、その場合、互いに他方のプライマーを錆型としてプライマーダイマーが生産されることになる。インターラーカレーター性蛍光色素は、プライマーダイマーへも非特異的にインターラーカレーションすることから、これに由来するバックグラウンドの増加が、本来目標とする特定核酸の増幅に基づく蛍光特性の変化を経時的に追跡する上で課題となる。

【0014】そこで、この解決策として、標的核酸の特定配列に相補的な核酸配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドにインターラーカレーター性蛍光色素を標識し、特定核酸と相補結合すると形成された二本鎖オリゴヌクレオチドにインターラーカレーションしその蛍光特性を変化するように設計した、特定の核酸配列の認識機能を具備するインターラーカレーター性蛍光色素標識プローブを用いる核酸の分析法が開発された（特願平7-185599号公報／EP公開第714986号公報／Nucleic Acids Research、24(24)、4992-4997(1996)）参照）。この方法によれば、プローブが特定核酸と相補結合を形成すると標識されているインターラーカレーター性蛍光色素の蛍光特性が変

化することから、相補結合を形成していないプローブを分離することなく、その相補結合の形成の有無及び形成された相補結合体の定量が可能となる。また、該プローブを特定核酸の増幅に先だって試料に添加しておけば、増幅工程中の反応液の蛍光強度を測定することにより、標的核酸の増幅されていく様子を配列特異的に経時的に追跡することも可能となる。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、インターラーカレーター性蛍光色素を用いる特定核酸配列の分析方法において、試料中に大量のゲノムDNAが存在する場合や、分析に先立つPCR法による増幅操作においてプライマーダイマーが生産された場合であっても特定核酸配列に特異的に高精度の分析が可能で、かつ、余剰プローブ等の分離操作やデネーチャーリング・アニーリング操作を行うことなく、一定温度にてその存在の有無及び量を決定することが可能な担体を使用しない均一系での分析方法を提供することを目的として検討を行い、その結果、本発明を完成するに至った。

【0016】すなわち本発明は、特定核酸を含むと予想される試料中の特定核酸の分析において、試料中の特定核酸を錠型として、その上流域にRNAポリメラーゼのプロモーター配列及びその下流域に前記特定核酸の核酸配列（特定核酸配列）を有する二本鎖DNAを生成するDNA生成工程と、該DNA及びRNAポリメラーゼによって特定核酸配列を有する一本鎖RNAを生成し測定するRNA生成・測定工程からなり、ここで該RNA生成・測定工程は、DNA生成工程終了後、その反応液に少なくともRNAポリメラーゼ、リボヌクレオシド三磷酸及び生成されるRNAに相補的な配列を含む、インターラーカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが存在することによって開始され、かつ、一定温度において実施され、反応液の蛍光強度を測定する工程を含み、デネーチャーリング・アニーリングからなるハイブリダイゼーション操作及び該工程により生成されるRNAと複合体を形成していないプローブを分離する操作を含まないことを特徴とする特定核酸分析方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】DNA生成工程では、特定核酸を錠型として、その上流域にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を、その下流域に特定核酸配列を有する二本鎖DNAを生成する。当該工程は、特定核酸配列に相補的な配列からなる一組のプライマーを用い、その一方のプライマーはその5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有すプロモータープライマーであって、さらにDNAポリメラーゼ及びデオキシリボヌクレオシド三磷酸を用いることで実施できる。

【0018】すなわち、前記のような一組のプライマーを用い、DNAポリメラーゼを複数回作用させてDNA伸張反応を行うことにより、前記のような二本鎖DNA

が生成されるのである。

【0019】本発明において使用するDNAポリメラーゼは、特に制限はなく、例えば大腸菌DNAポリメラーゼIII、クレノウフラグメント、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Thermus aquaticus DNAポリメラーゼ、Thermus thermophilus DNAポリメラーゼ等を用いることができる。

【0020】本発明で用いられるプロモータープライマーは、前述の通り、5'末端から3'末端に向かって、少なくとも、RNAポリメラーゼのプロモーター配列、特定核酸配列に相補的な配列を順次有するよう設計される。特定核酸に相補的な配列部分は、特定核酸配列の全体に相補的である必要はなく、特定核酸配列の一部に對してあれば良い。当該部分の長さは、特定核酸に相補的な核酸に対する特異性を担保するため、6—100ヌクレオチド、特に10—30ヌクレオチドとすることが好ましい。なお、プロモータープライマーにおけるRNAポリメラーゼのプロモーター配列と特定核酸配列に相補的な配列部分は、いずれの配列とも関係しない少數の塩基（リンカー塩基）を介して結合されていても良い。DNA生成工程において、特定核酸がRNAである場合には、前述したようなDNAの伸長反応を行う前に、特定核酸を錠型とするcDNAの合成を行えばよい。この操作には、特定核酸配列に相補的な配列を含む前述の一組のプライマー、逆転写酵素及び逆転写酵素の基質であるデオキシリボヌクレオシド三磷酸を使用すれば良い。ここで使用するプライマーは、前述のDNA生成工程における、一組のプライマーのうち少なくとも一方のプライマーであってもよいが、その場合は、cDNA合成に引き続いて行われるDNAポリメラーゼの作用による二本鎖DNAの合成において、他方のプライマーが反応液に添加される必要がある。尚、逆転写酵素に特に制限はなく、商業的に容易に入手可能なものが利用可能である。さらに、逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを用いれば、前記の一組のプライマー、該DNAポリメラーゼ及びデオキシリボヌクレオシド三磷酸を混合して試料に添加しておけば、cDNAの生成操作と上記二本鎖DNA生成操作とを連続的に実施することができる。

【0021】DNA生成工程に続くRNA生成・測定工程では、生成した二本鎖DNAにRNAポリメラーゼを作用させ、特定核酸配列を有する一本鎖RNAを生成するとともに、該生成したRNAを測定する。

【0022】この工程は、DNA生成工程の終了後、その反応液に少なくともRNAポリメラーゼ、リボヌクレオシド三磷酸及び生成されるRNAに相補的な配列を有するインターラーカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが存在することによって開始される。従って、DNA生成工程後、これら試薬を添加するのみで、RNA生成

・測定工程を開始することができる。上記プローブは生成されたRNAと相補結合を形成し、該プローブに標識されているインターラーカレーター性蛍光色素の蛍光特性が変化する。そこで、反応液の蛍光強度を測定することによって、試料中に特定核酸が存在していたか否か及びその初期量を決定することができる。RNA生成・測定工程で使用するRNAポリメラーゼには特に制限はなく、例えば、T7 RNAポリメラーゼやT3 ポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼなどの商業的に容易に入手可能なものが使用できる。

【0023】本発明で使用するプローブは、RNAポリメラーゼの作用によって生成されるRNAに特異的に相補的結合するオリゴヌクレオチドを、二本鎖DNAにインターラーコレーションしてその蛍光特性が変化するインターラーカレーター性蛍光色素で標識したものである（特願平7-185599号公報／EP公開第714986号公報／Nucleic Acid Research、24(24)、4992-4997(1996)参照）。ここで、インターラーカレーター性蛍光色素としては、二本鎖DNAにインターラーコレーションし蛍光特性が変化するものであれば特に制限はないが、インターラーコレーションにより蛍光強度が増加する性質を有するものが測定の容易性等の点から好ましく、特に蛍光強度の変化の著しいチアゾールオレンジ、オキサゾールイエロー又はそれらの誘導体が好ましい。

【0024】インターラーカレーター性蛍光色素は、共有結合等によってオリゴヌクレオチドへ標識されるが、適当な分子長のリンカーを介して標識されてもよい。リンカーとしては、インターラーカレーター性蛍光色素が二本鎖DNAにインターラーコレーションすることを妨げない分子であれば特に制限はないが、両末端に官能基を有する二官能性炭化水素から選択されるリンカーモノマーは、オリゴヌクレオチドへの修飾を行う上で簡便で好ましい。また例えば、市販の試薬セット（C6-Thioldmodifielder、Clontech製）を使用することもできる。インターラーカレーター性蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの標識部位は、オリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端又は中央部分等、インターラーカレーター性蛍光色素の二本鎖DNAへのインターラーコレーションが妨げられず、かつ、オリゴヌクレオチドのRNAとの相補結合を阻害しない限り、いずれの部位であっても良い。なお、プローブのRNAに相補的な塩基配列の長さは、RNAに対する特異性を担保するため、6-100ヌクレオチド、特に10-30ヌクレオチドとすることが好ましい。以上のように、本願発明の分析方法では、インターラーカレーター性蛍光色素で標識したプローブの存在下でRNAポリメラーゼを作用させることによって、該プローブが転写産物であるRNAと相補結合することから、デネーチャーリング・アニーリングからなるハイブリダイゼーション操作を一切行うことなく、反応液の蛍光の測

定から試料中の標的核酸の有無及び量を高精度に分析することが可能となる。すなわち、試料中の特定核酸の初期量に依存して生成されるRNAが該プローブと相補結合を形成すると、該プローブに標識されているインターラーカレーター性蛍光色素の蛍光特性が変化することから、相補結合に寄与しなかった余剰のプローブを分離する工程を必要とせずに、その相補結合の形成の有無及び形成された相補結合体の定量が可能となり、特定の核酸配列からなる核酸の均一系での簡便な一段階の分析方法が提供されるのである。

【0025】本発明のDNA生成工程において、PCR法を行うことも可能である。これにより、DNA生成工程において、上流域にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有し下流域に特定核酸配列を有する二本鎖DNA配列の生成量を増幅しておき、これを前述のRNA生成・測定工程に供すればよい。PCR法による増幅操作を行う場合には、DNA生成工程において、前記のような一組のプライマーを使用し、デネーチャーリング・アニーリングのための加温・冷却操作等を繰り返すという、通常のPCR法を実施すればよい。

【0026】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

【0027】図1は、試料中の特定核酸が一本鎖RNAの場合について示したものである。DNA生成工程では、先ず、逆転写用のプライマー及びデオキシリボヌクレオシド三磷酸の存在下、逆転写酵素によって特定核酸のcDNAを合成する。合成されたcDNAは、特定核酸配列に対して相補的な配列を有する。

【0028】この反応液に、特定核酸配列の5'側と同一の配列を有するプロモーター・プライマー及び耐熱性DNAポリメラーゼを添加し、PCR法を行う。これによって、5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター領域を有する二本鎖DNAが得られる。

【0029】引き続き、RNA生成・測定工程に移る。反応液にインターラーカレーター性蛍光色素で標識したプローブ、RNAポリメラーゼ及びリボヌクレオシド三磷酸を含む試薬を添加し、RNAポリメラーゼの至適温度にてインキュベーションを行う。RNAポリメラーゼの作用によって、DNA生成工程において生成されたプロモーター領域を有する二本鎖DNAをもとに、特定核酸配列を有するRNAが転写される。転写されたRNAは反応液中に共存するインターラーカレーター性蛍光色素で標識したプローブと相補結合を形成し、複合体の形成量に依存して蛍光強度が増大する。従って、この工程の前後、又は工程中の反応液の蛍光強度を測定することにより、特定核酸の有無及び当初の特定核酸量を分析することができる。

【0030】試料中の特定核酸が二本鎖DNAの場合

は、前記プライマー及びプロモータープライマーから成る一組のプライマー、デオキシリボヌクレオシド三磷酸及び耐熱性DNAポリメラーゼを添加しPCRを行えば、RNAポリメラーゼのプロモーター領域を有する二本鎖DNAを生成することができるため、以後の操作を前記と同様に実施すれば良い。

【0031】実施例1

本発明の分析方法により、組み換え体HCV RNAを測定し、その検出下限界を評価した。

【0032】(1)組み換え体HCV RNA(加藤らの塩基番号1~1863を含む/Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524-9528)を、以下の組成のRNA希釈液で50、10、5、0コピー/10μlとなるように希釈し、検体とした。

RNA希釈液の組成

10mM Tris-HCl (pH8.0)

0.1mM EDTA

100μl/m1酵母RNA

(2)以下の組成の反応液5μlをPCR用チューブに分注し、これに上記検体10μlを添加した。

反応液の組成

30mM Tris-HCl (pH8.3)

5'-ATTAGGTGACACTATAGAATACAAACA
CTCCACCAGATCACTC-3'

(5)サーマルサイクラーにて以下の条件でPCRを行った。

PCR条件

(a) 95°C 9分間

引き続き以下の(b)~(d)より成るサイクルを40サイクル行った。

(b) 95°C 30秒間

(c) 65°C 30秒間

(d) 72°C 1分間

(6)得られたPCR反応液70μlに下記組成の転写反応液6.3μlを混合しこの混合液を蛍光分光光度計内にて37°Cに保温した石英セルに移した。

転写反応液の組成

7.5. 3mM Tris-HCl (pH8.0)

1.5. 1mM MgCl2

1.0. 7mM DTT

0.86mM NTPs

4. 3mM スペルミジン

2. 2U/μl RNase Inhibitor

5.3. 6nM YO-271(インターラーカーティ性蛍光色素標識プローブ)；

5'-CTCGC*GGGGGCTG-3'

(*は、インターラーカーティ性蛍光色素の標識位置を示す)

(7)引き続き、上記反応液に30U/μlのSP6

150mM KC1

1.3. 6mM MgCl2

4. 3mM NTPs

3mM DTT

3U/μl RNase inhibitor

6U/μl MMLV逆転写酵素

3. 6μM プライマー；

5'-ACTCGCAAGCACCTATC-3'

(3)サーマルサイクラーにて以下の条件で逆転写反応を行った。

逆転写反応条件

42°C 10分間

99°C 6分間

(4)以下の組成のPCR反応液60μlを添加した。

PCR反応液の組成

10mM Tris-HCl (pH8.3)

50mM KC1

1.6mM MgCl2

0.025% ノニデットP-40

37.5U/m1 ホットスタート専用Taq qDNAポリメラーゼ

0.3μM プロモータープライマー；

5'-ATTAGGTGACACTATAGAATACAAACA
CTCCACCAGATCACTC-3'

RNAポリメラーゼ4.7μlを添加して全量140μlとし、37°Cにて蛍光強度を30分間モニターした(励起波長490nm、蛍光波長510nm)。

【0033】(8)0コピーの蛍光増加の平均と標準偏差をもとめ、(平均値)+3×(標準偏差)を当法の判定基準とした。

【0034】30分間における蛍光増加と検出率を図2に示した。10コピーの蛍光増加は0コピーと有意な差が認められ(t検定、有意水準1%)、10コピーの組み換え体HCV RNAが検出可能であった。

【0035】SP6 RNAポリメラーゼの添加直後に反応液を一部採取し、アガロース電気泳動後、エチジウムプロマイドで染色したときのバンド黒化度からDNA量を定量した結果と蛍光増加との相関関係を図3に示した。PCR生成量と蛍光増加は良好な相関を示した。以上から、本発明によって試料中の特定核酸を配列特異的に高感度に分析できることが確認できた。

【0036】実施例2

本発明の分析方法により慢性C型肝炎患者血清20検体を測定し、市販のHCV RNA検出キット(アンプリコアHCV、日本ロシュ製)との相関を評価した。

【0037】(1)有機溶媒及び蛋白質変性剤を用いて、慢性C型肝炎患者血清20検体のそれぞれ120μlから核酸を抽出した。

【0038】(2)上記の市販キットを用いた測定にお

いっては、抽出した核酸沈殿を付属の検体希釈液7.2 μlに溶解し、このうち5.0 μlを測定に用いた。また測定操作は該添付文書に従った。

【0039】(3) 本発明においては、抽出した核酸沈殿を下記組成の検体希釈液14 μlに溶解しこのうち10 μlを測定に用いた。分析操作は実施例1と同様である。

検体希釈液の組成

1.0 mM Tris-HCl (pH 8.0)

0.1 mM EDTA

100 μg/ml 酵母RNA

1 mM DTT

2U/μl RNase Inhibitor

(4) 市販キットにより陰性(−/−)と判定された検体について、反応時間30分間における蛍光増加を算出し、標準偏差を求めた。(蛍光増加の平均値) + 3 × (標準偏差)を当法の判定基準(3.3)とした。

【0040】市販キットとの相関を表に示す。市販キットで(+/−)と判定されたものを判定保留とし、陰性(−/−)及び陽性(+/+)と判定されたものについて当法の判定結果と比較すると、一致率は81.3% ($\{(4+9)/(7+9)\} \times 100 = 13/16 \times 100 = 81.3$)であった。

【0041】

【表1】

		本法			計
		+/+	+/−	−/−	
Amplicore 結果	+/+	4	0	3	7
	+/−	0	1	3	4
	−/−	0	0	9	9
計		4	1	15	20

【0042】以上より、本発明の分析方法が、従来法に比してより簡便に臨床試料中の特定核酸の検出が可能であることが確認できた。

【0043】実施例3

本発明の分析方法により組み換え体HCV RNAを測定し、検出系の検出下限界を評価した。

【0044】(1) 組み換え体HCV RNA(加藤らの塩基番号1~1863を含む)をRNA希釈液で5.0、10.0、5.0、1.0コピー/10 μlとなるように希釈し、検体とした。なお、RNA希釈液は実施例1と同様である。

5' - GCACTCGCAAGCACCCCTATCA - 3'

(3) サーマルサイクラーにて下記条件にて逆転写反応を行った。

逆転写反応条件

42°C 10分間

99°C 6分間

(4) 下記組成のPCR反応液6.0 μlを添加した。

PCR反応液の組成

5' - ATTAGGTGACACTATAGAATACAACA
CTCCACCATAGATCACTCCCCCTG - 3'

(5) サーマルサイクラーにて下記条件でPCRを行った。

PCR条件

(a) 95°C 9分間

引き続き、以下の(b)~(d)より成るサイクルを40サイクル行った。

(b) 95°C 30秒間

(c) 67°C 30秒間

【0045】(2) 下記組成の反応液5 μlをPCR用チューブに分注し、これに検体10 μlを添加した。

反応液の組成

3.0 mM Tris-HCl (pH 8.3)

1.50 mM KC1

1.3.6 mM MgCl2

4.3 mM dNTPs

3 mM DTT

3U/μl RNase inhibitor

6U/μl MMLV逆転写酵素

3.6 μM プライマー;

5' - GCACTCGCAAGCACCCCTATCA - 3'

1.0 mM Tris-HCl (pH 8.3)

5.0 mM KC1

1.6 mM MgCl2

0.025% ノニデットP-40

37.5 U/ml ホットスタート専用Taq DNA

ポリメラーゼ0.3 μl プロモータープラマー;

(d) 72°C 1分間

(6) 得られたPCR反応液7.0 μlに転写反応液6.5 μlを混合し、これを蛍光分光光度計内にて37°Cに保温した蛍光石英セルに移した。転写反応液は実施例1と同様である。

【0046】(7) 引き続き、上記反応液に30 U/μlのSP6 RNAポリメラーゼ4.7 μlを添加して全量を14.0 μlとし、37°Cにて蛍光強度を30分間

モニターした（励起波長490 nm、蛍光波長510 nm）。

【0047】(8) 0コピーの蛍光増加の平均と標準偏差をもとめ、(平均値) + 3 × (標準偏差)を当法の判定基準とした。

【0048】各濃度についての蛍光増加と検出率を図4に示す。10コピー以上の組み換え体HCV RNAを含む試料では、それらの全てを陽性として検出可能であった。5コピーではそれらの87.5%が検出可能であった。以上から、本発明によって特定核酸を配列特異的に高感度に検出できることが確認できた。

【0049】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、本発明によれば、特定核酸を含むと予想される試料の分析において、蛍光強度等を測定するRNA生成・測定工程に際し、担体を使用することなく、かつ、相補結合に寄与しなかった余剰プローブの分離を行うことなしに、その存在の有無及び量を均一系で、簡便に分析することが可能である。しかも、本発明では、該工程に際してデネチャーリング・アニーリングという操作を行う必要はなく、一定温度にて、単に必要な試薬を反応液に添加しその蛍光強度等を測定すればよいことから、該試薬の接触という一段階の操作のみで実施することが可能である。

【0050】すなわち、本発明によれば、プローブがRNA生成・測定工程で生成されるRNA（特定核酸配列と同一の塩基配列を有する）と相補結合を形成すると、プローブに標識されているインターラーカレーター性蛍光色素の蛍光強度の増加等、その蛍光特性が変化することから、相補結合に寄与しなかった余剰プローブを分離する工程を必要とせずに、その相補結合の形成の有無の検出及び形成された相補結合体の定量が可能となることから、用いるインターラーカレーター性蛍光色素の励起波長及び蛍光波長において光学的に透明な材質の容器を使用す

れば、試料容器内部から反応液を採取して分析する必要がなくなり、増幅産物の飛散に由来する擬陽性の惹起という課題を回避しつつ、連続的な分析が可能となる。

【0051】また、本発明によれば、プローブが特定核酸配列を特異的に識別し相補結合を形成することによって蛍光特性が変化することから、DNA生成工程にいてPCRを実施した場合であって、プライマーダイマー等の副産物が生成した場合でも、プライマーダイマーは、プローブとの複合体形成に関与せず、従って反応液の蛍光特性の変化に寄与しない。そこで、反応液の蛍光特性の変化を測定することによって、PCR後にプライマーダイマーの分離を行うことなしに、特定核酸のみを配列特異的に分析することが可能である。さらに、本発明によれば、RNA生成・測定工程は、DNA生成工程の終了後に、その反応液にRNAポリメラーゼ、リボヌクレオシド三磷酸及びプローブを添加する等することで開始できるのであるから、反応液を容器間で移し換える等の煩雑な操作が不要となり、臨床診断等で用いるのに極めて簡便な分析法が提供できる。

【図面の簡単な説明】

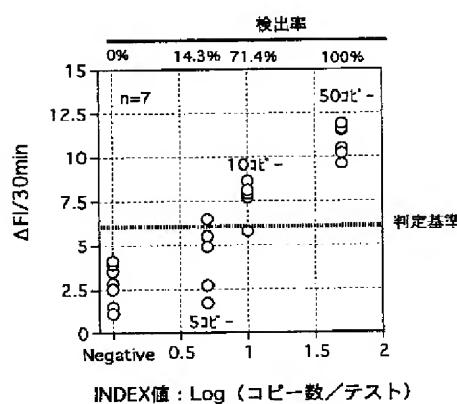
【図1】図1は試料中の標的核酸が一本鎖RNAの場合の概要の一例を示す図である。

【図2】図2は本発明の分析方法によって組換え体HCV RNAを測定したときの初期コピー数と蛍光強度とを示す図である。図中、縦軸は、in vitro 転写30分間に増加した蛍光強度を示す。

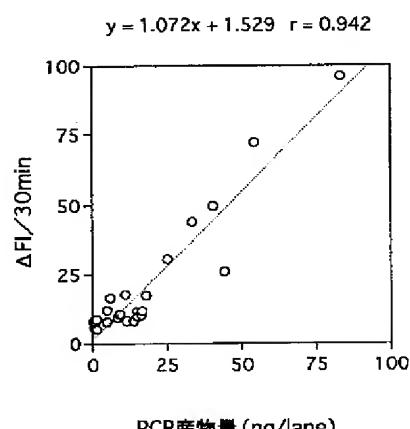
【図3】図3は本発明の分析方法によって組換え体HCV RNAを測定したときの標的核酸のPCR産物量と蛍光強度とを示す図である。

【図4】図4は本発明の分析方法によって組換え体HCV RNAを測定したときの初期コピー数と蛍光強度とを示す図である。

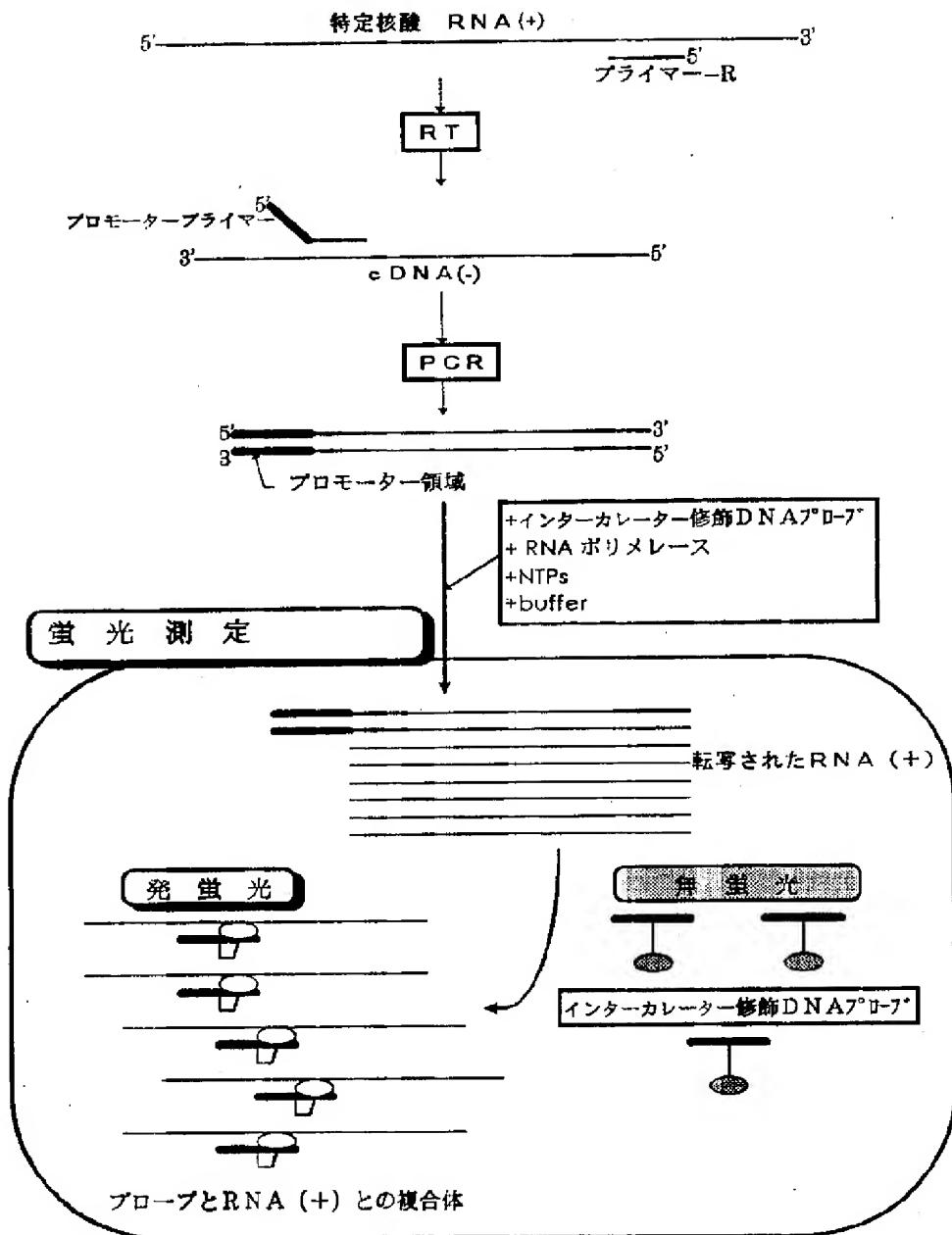
【図2】



【図3】



【図1】



【図4】

